раста. Результаты исследований проб фекалий животных свидетельствуют о значительной разнице в количественных показателях инвазированности фасциолами крупного рогатого скота разного возраста. Наибольшая инвазированность фасциолами отмечена нами у крупного рогатого скота старше 5 лет. Экстенсивность инвазии составила у молодняка до года 3,0%, у животных в возрасте – 1-3 лет 10%, 4-5 лет – 20%, 6-8 лет – 21% и крупного рогатого скота старше 8 лет 23,2%. Как видно из полученных результатов, инвазирсванность крупного рогатого скота фасциолами повышается с возрастом животных. Количество яиц фасциол в г фекалий также повышается с возрастом крупного рогатого скота, что, вероятно, обусловлено и более высокой их инвазированностью. Количество яиц фасциол в г фекалий крупного рогатого скота составило у выпасавшихся инвазированных телят до 1 года 18, у животных 1-3 лет 32,5±7,2, 4-5 лет – 76,3±6,0, 6-8 лет – 90,4±7,3 и у животных старше 8 лет – 87,5±6,8 экз.

По результатам гельминтологических вскрытий печени и желчного пузыря 160 голов крупного рогатого скота разного возраста 38 голов были инвазированы F.hepatica. Средняя экстенсивность инвазии составила 23,7%. Экстенсивность инвазии была у выпасавшегося крупного рогатого скота в возрасте до года 7,1%, 1-3 лет - 17,1%, 4-5 лет – 23,7%, 6-8 лет – 27,0% и старше 8 лет 27,7% при интенсивности инвазии, соответственно 5,0; 16,3+3,7; 27,0+4,8; 48,9±6,2 и 63,2+7,0 экз./гол.

Таким образом, полученные нами результаты копроовоскопических исследований и гельминтологических вскрытий печени и желчного пузыря крупного рогатого скота позволяют подтвердить данные В.А.Ромашова, И.Д.Шемякина (1995) и других исследователей о повышении с возрастом животных количественных показателей: экстенсивность инвазии с 7,1 до 27,7%, интенсивности инвазии с 5,0 до 63,2 экз./гол. и среднего количества яиц фасциол в г фекалий с 18,0 до 87,5 экз.

Сезонная динамика инвазированности крупного рогатого скота F. hepatica. Результаты копроовоскопии показали, что фасциолез крупного рогатого скота регистрируется во все сезоны года. Однако экстенсивность инвазии у взрослого крупного рогатого скота колеблется от 40,3 до 59,2%. Средняя экстенсивность инвазии оказалась равной 49,7%. Пик фасциолезной инвазии у крупного рогатого скота отмечали в зимний период (59,2%), что, по-видимому, связано с достижением большинством фасциол новой генерации имагинальной стадии.

Среднее количество яиц фасциол в г фекалий крупного рогатого скота составило 99,9+8,4 экз. с незначительным повышением количества яиц в весенне-летний период.

По результатам гельминтологических вскрытий печени взрослого крупного рогатого скота инвазированность его в разные сезоны года также отличалась незначительно (P > 0,05) и составила, в среднем, летом в июле 44,6%, осенью (октябрь) 54,7%, зимой (январь) 60,0% и весной (апрель) 55,2%. Установлена небольшая разница в интенсивности фасциолезной инвазии в разные сезоны года.

УДК: 616.985.51.539.107

Г.Р. Юсупова
Казанская государственная академия ветеринарной медицины

ОБ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ВАКЦИНЫ ИЗ ШТАММА «КС» В КАЧЕСТВЕ АНТИГЕНА В ИФА ПРИ ОБНАРУЖЕНИИ ПРОТИВОЧУМНЫХ АНТИТЕЛ

Введение.

Классическая чума свиней (КЧС) является очень заразной болезнью домашних и диких свиней, во многих случаях приводящей к летальному исходу. Она сопровождается лихорадкой, лейкопенией, кровотечениями и др. Болезнь включена в список А Международного эпизоотического бюро. Хотя КЧС ликвидирована во многих европейских странах, вирус все еще угрожает свиноводству, главным образом в связи с его распространенностью в ряде европей-

ских популяций диких свиней (Mittelholzer C. et.al., 2000). В 1990-х гг. в Европе имело место несколько вспышек КЧС. Наиболее серьезная из них произошла в 1997 г. в Нидерландах (Stegeman A. et. al., 2000).

Благодаря широкомасштабной вакцинации в России эпизоотическая ситуация по КЧС стабилизировалась (Е.А. Непоклонов, 2000) и по данным Департамента ветеринарии Минсельхоза России, данное заболевание зарегистрировано в 2007 году лишь в 5 пунктах.

По данным В.В. Куринова (1999, 2003), Р.Х. Юсупова (1994, 2002) определение уровня специфических антител в сыворотке крови свиней с помощью РН и РНГА в вакцинированном стаде важно для оценки иммунного статуса животных и проведения противочумных мероприятий.

Целью наших исследований явилось изучение возможности применения усовершенствованного непрямого варианта ИФА для обнаружения поствакцинальных к вирусу КЧС антител.

Материалы и методы.

При разработке метода ИФА для определения антител к возбудителю КЧС в сыворотке крови иммунизированных свиней реакцию непрямого твердофазного ИФА проводили по методу, описанному Voller A. et al. (1977). В лунки планшета для иммунологической реакции вносили антиген (вирусвакцина против КЧС, штамм «КС») по 100 мкл в 0,01М фосфатно-буферном растворе (pH 8,3) по 5 лунок на каждую пробу сыворотки. Инкубировали 16-18 ч при 20°С и антиген сливали. После трехкратного промывания физиологическим раствором в лунки вносили по 100 мкл иммунных и контрольных сывороток, разведенных в 0,01М фосфатно-солевом буфере (pH 7,3), содержащем 0,05М твин-20 (ТФСБ). Инкубировали 1 ч при 37°С и промывали лунки 3-4 раза раствором 0,5М NaCl, подтитрованным IМ K_2HPO_4 pH 7,3 и содержащем 0,05М твин-20. После удаления остатков раствора в лунки вносили по 100 мкл антивидового конъюгата, разведенного в ТФСБ. После инкубации в течение 2 ч при 37 °С промывали как и прежде и добавляли 100 мкл свежеприготовленного раствора субстрата. Планшет выдерживали в темном месте 30-40 мин при комнатной температуре, а затем реакцию останавливали добавлением 100 мкл 2 н H_2SO_4 в каждую лунку. Учет реакции ИФА проводили, как описано ранее, на вертикально сканирующем спектрофотометре Titertek multiskan (Швейцария). Положительно реагирующими считали пробы сыворотки крови с $K_{спец}$ + 2 и выше. При разработке метода ИФА предварительно устанавливали оптимальные концентрации реагентов, определяли основные условия его проведения. Уровень антител в сыворотках крови животных параллельно определяли в РНГА в описании А.В. Иванова, Р.Х. Юсупова и др. (2007). Набор препаратов для определения в РНГА специфических антител у свиней, вакцинированных против классической чумы, любезно предоставил зав. лаб. иммунологии ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» к.в.н. Чернов А.Н. В опытах исследовали 20 проб сывороток крови подсвинков, иммунизированных против КЧС вакциной из штамма «КС». Сыворотки крови свиней любезно были предоставлены соискателем лаборатории иммунологии Нуриевым Р.А.

Результаты исследований и обсуждение.

Непрямой вариант ИФА для выявления антител в сыворотке крови животных включает многоэтапные процессы взаимодействия различных компонентов реакции. Поэтому для достижения высокой чувствительности метода большое значение имело определение основных параметров постановки реакции – изучение условий адсорбции специфического антигена и искомого антитела на твердофазный носитель, взаимодействие иммунной сыворотки и антивидового конъюгата. Исходя из этого, в специальных опытах устанавливали оптимальные условия постановки самой реакции: определяли основные параметры иммобилизации антигена и антител на полистирол; влияние pH буферного раствора, температурного фактора, времени инкубации и др. Следует особо отметить, что при разработке непрямого варианта ИФА для титрования специфических антител для сенсибилизации планшетов в качестве антигена впервые использовали вирусвакцину из штамма «КС».

Подбор условий иммобилизации антигена осуществляли путем изменения pH среды, температуры и времени инкубации. Влияние заряда буфера на иммобилизацию антигена изучали при диапазоне pH 7,2-10,0, используя 0,01М фосфатный и карбонатно-бикарбонатный буферные растворы. Данные исследования показали, что максимальное связывание антигена с полистиролом отмечается при условии, когда pH буферного раствора равен 9,6. Сдвиг этого показателя в ту или другую сторону приводил к уменьшению адсорбционной способности антигена в лунки планшета. Наши данные согласуются с результата-

Таблица

Результаты исследований в ИФА и РНГА сывороток крови подсвинков, иммунизированных против классической чумы вакциной «КС»

№ п/п	Титры антител		
	до иммунизации	на 21-й день иммунизации	
		РНГА	ИФА
1.	0	1:8	1:80
2.	0	1:8	1:80
3.	0	1:16	1:320
4.	0	1:32	1:320
5.	0	1:32	1:320
6.	0	1:8	1:80
7.	0	1:16	1:320
7.	0	1:32	1:320
9.	0	1:32	1:320
10.	0	1:16	1:80
11.	0	1:16	1:160
12.	0	1:64	1:640
13.	0	1:32	1:320
14.	0	1:16	1:160
15.	0	1:16	1:320
16.	0	1:16	1:160
17.	0	1:32	1:320
18.	0	1:8	1:40
19.	0	1:16	1:160
20.	0	1:64	1:640

ми опытов Н.А. Хисматуллиной (1988) при изучении бешенства с.-х. животных.

Характерные результаты были получены и при изучении влияния температуры инкубации (от +4 до 37 °С) на адсорбционные свойства этого антигена. Оказалось, что максимальное связывание антигена наблюдается при 37 °С. Дальнейшее повышение температуры среды приводило к значительному снижению адсорбции в лунки планшетов.

Значительное влияние, как и следовало ожидать, на иммобилизацию антигена в лунки полистироловых планшетов оказывала продолжительность ее экспозиции (1-18 ч). Наивысшее значение коэффициента специфичности было получено при иммобилизации антигена в течение 3 ч при 37°С. Этот срок и был принят за оптимальный для проведения непрямого ИФА при выявлении специфических антител к возбудителю КЧС. Далее исследования показали, что максимальная величина коэффициента специфичности отмечается при адсорбции антигена в концентрации 60 мкг/мл. Дальнейшее уменьшение или увеличение его концентрации приводило к снижению специфичности реакции.

В дальнейших опытах изучали особенности взаимодействия специфической сыворотки, с иммобилизованным на поверхности полистирола антигеном вируса КЧС. В частности, необходимо было установить кинетику взаимодействия антител с иммобилизованным на полистироле специфическим антигеном в интервале от 30 мин до 6 ч при инкубировании компонентов в 0,01М фосфатно-буферном растворе (ФБР), рН 7,3 с 0,05%-ным сорбиталь С20 при 37 °С. Результаты исследований показали, что оптимальным сроком инкубации специфических антител с иммобилизованным антигеном является 2 ч при +37°С. При этом достигается максимальная чувствительность реакции (титр антител в ИФА составил 1:1000 при $К_{сп}1$ = 2,44±0,014; $К_{сп}2$ = 2,37±0,015). В более короткий срок инкубации полного связывания антигена с сыворотками не происходило, а увеличение ее продолжительности не только удлиняло время постановки реакции, но и способствовало появлению фонового окрашивания.

Исключительно важным для проведения ИФА является определение кинетики связывания и концентрации антивидового иммунопероксидазного конъюгата. В наших опытах максимальное значение коэффициента специфичности было констатировано при взаимодействии конъюгата с

иммунной сывороткой в течение 1 ч.

Таким образом, в результате опытов, удалось отработать непрямой метод ИФА, обеспечивающий обнаружение специфических антител в сыворотке крови вакцинированных свиней. Результаты представлены в табл.

При этом впервые показана возможность использования в качестве специфического антигена для сенсибилизации планшет вакцинного штамма «КС» вируса классической чумы свиней. Были найдены опытным путем оптимальные концентрации компонентов реакций и условия ее проведения. Специфичность, активность и эффективность разработанного варианта ИФА была доказана при исследовании 20 проб сывороток крови свиней, иммунизированных против указанного возбудителя. В опыт были взяты сыворотки крови свиней, содержащие специфические к вирусу КЧС антитела в различных титрах, выявляемых с помощью РНГА.

Заключение.

Таким образом, разработана и установлена эффективность непрямого варианта ИФА для обнаружения специфических антител в сыворотке крови свиней, иммунизированных против классической чумы. Впервые показана пригодность в качестве специфического антигена аттенуированной вакцины против КЧС (штамм «КС») для сенсибилизации планшет в ИФА. На основании изложенного непрямой вариант ИФА рекомендуется использовать при определении иммунного статуса свиней, вакцинированных против КЧС.

РЕЗЮМЕ

Непрямой вариант ИФА обеспечивает обнаружение специфических антител в сыворотке крови свиней, вакцинированных против классической чумы.

SUMMARY

Indirect ELISA provides specific antibody in swine sera, vaccinated against classical swine fever.

Литература

1. Иванов, А.В. Методические рекомендации по диагностике, профилактике и ликвидации классической чумы свиней / А.В. Иванов, Р.Х. Юсупов и др.// Казань, 2007. 18 с.
2. Куриннов, В.В. Сравнительное исследование напряженности иммунитета против классической чумы свиней промышленных свинокомплексов /В.В. Куриннов// Вет. газета. 2003. № 10. С. 7.
3. Куриннов, В.В. Эпизоотологические, клинические и диагностические исследования при КЧС / В.В. Куриннов// Докл. Россельхозакадемии. 1999. № 1. С. 42-44.
4. Непоклонов, Е.А. Дисс... д.б.н. Москва, 2000.
5. Юсупов, Р.Х. Иммунологический мониторинг системе защиты животных от инфекционных болезней /Р.Х. Юсупов // Матер. Всерос. научн.-произв. конф. Чебоксары. 1994. С. 499-500.
6. Юсупов, Р.Х. Вакцинопрофилактика классической чумы свиней / Р.Х. Юсупов, С.Р. Янбарисова, Р.А. Нуриев // Вет. врач. 2002. №4. С. 66.
7. Mittelholzer C. et al. Analysis of classical swine fever virus replication kinetics allows differentiation of highly virulent from avirulent strains // Vet. Microbiol. 2000. № 74. p. 293-308.
8. Stegeman A. et al. The 1997-1998 epidemic of classical swine fever in the Netherlands // Vet. Microbiol. 2000. №73. p. 183-196.
9. Voller A. et al. / Enzym immunoassay with special reberence to ELISA techniques // J. Clin. Path. 1977. № 35. p. 507-520.